



DOI:10.22144/ctu.jvn.2025.x

NGHIÊN CỨU CÁC ĐIỀU KIỆN TỐI ƯU CHO SẢN XUẤT CHẾ PHẨM PROBIOTIC ĐỊNH HƯỚNG THAY THẾ KHÁNG SINH TRÊN GIA CẦM TỪ CÁC CHỦNG LACTIPLANTIBACILLUS

Phan Vũ Hải¹, Hoàng Thị Anh Phương², Trần Thị Na¹, Hoàng Chung¹, Nguyễn Xuân Hòa¹

¹Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

²Trường Đại học Tây Nguyên

Tác giả liên hệ (Corresponding author): phanvuhai@hueuni.edu.vn

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received):

02/10/2024

Sửa bài (Revised):

01/11/2024

Duyệt đăng (Accepted):

06/11/2024

Title: Study on optimal conditions for the production of probiotic alternatives to antibiotics in poultry using Lactiplantibacillus strains

Affiliation(s): ¹Hue University, ²Tay Nguyen University

Nghiên cứu này tập trung tối ưu hóa quy trình sản xuất chế phẩm sinh học từ Lactiplantibacillus bản địa ứng dụng trong chăn nuôi gà, nhằm thay thế kháng sinh. Từ 68 chủng Lactiplantibacillus được phân lập từ phân gà, trong đó có 5 chủng kháng khuẩn tốt nhất chống lại vi khuẩn gây bệnh trên gà (Escherichia coli FG31-1, Salmonella typhimurium FC13827 và Proteus mirabilis MPE4069) đã được lựa chọn và đánh giá về tính an toàn. Bốn chủng (L. plantarum L3, L. plantarum L8, L. acidophilus L18, và L. agilis L27) được nuôi cấy trên các môi trường khác nhau, trong đó môi trường Mgl (chứa glucose) và Mlac (bột sữa gầy) cho sinh trưởng tốt nhất. Thử nghiệm lên men bán công nghiệp với các chủng này xác định tốc độ khuấy tối ưu là 50 vòng/phút, đạt sinh khối 0,6 g/L. Nghiên cứu cung cấp thông tin quan trọng về lựa chọn chủng và tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy Lactiplantibacillus bản địa, hướng đến hạn chế sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi gà. Tuy nhiên, cần có thêm các nghiên cứu in vivo để đánh giá hiệu quả của sản phẩm này trong điều kiện thực tế.

Từ khóa: Bán công nghiệp, gà thịt, Lactiplantibacillus, môi trường nuôi cấy, thay thế kháng sinh

ABSTRACT

This study focused on optimizing the production process of probiotics from native Lactiplantibacillus for use in chicken farming, aiming to replace antibiotics. From 68 Lactiplantibacillus strains isolated from the chicken feces, five strains with the best antibacterial activity against Escherichia coli, Salmonella typhimurium FC13827 and Proteus mirabilis were selected and evaluated for safety. Four strains (L. plantarum 1582, L. plantarum JDM1, L. acidophilus NCFM, and L. agilis DSM 20509) were cultured in different media, of which the medium Mgl (containing glucose) and Mlac (containing skim milk powder) gave the best growth. Semi-industrial fermentation tests with these strains determined the optimal agitation speed to be 50 rpm, achieving a biomass of 0.6 g/L. The study provides important information on strain selection and optimization of culture conditions for native Lactiplantibacillus, aiming at reducing antibiotic use in chicken farming. However, further in vivo studies are needed to evaluate the efficacy of this product under real conditions.

Keywords: Antibiotic alternative, broiler, culture medium, Lactiplantibacillus, semi-industrial

1. GIỚI THIỆU

Probiotic, được định nghĩa là "vi sinh vật sống khi được đưa vào cơ thể với số lượng đầy đủ sẽ mang lại lợi ích cho sức khỏe của vật chủ" (Ganguly et al., 2011), được xem là một giải pháp hiệu quả có lợi cho sức khỏe của vật nuôi, đặc biệt trong bối cảnh giảm thiểu việc sử dụng kháng sinh. Sự quan tâm ngày càng tăng đối với ứng dụng chế phẩm vi sinh vật cho ăn trực tiếp tạo nên động lực thúc đẩy việc loại bỏ việc sử dụng kháng sinh chăn nuôi; nồng độ kháng sinh thấp được tìm thấy trong môi trường tự nhiên dẫn đến làm giàu quần thể vi khuẩn kháng thuốc (Ganguly et al., 2011). Các lợi khuẩn góp phần thay đổi quần thể vi sinh vật trong hệ tiêu hóa bằng cách cân bằng số lượng hệ vi sinh vật có lợi và có hại (Medellin-Peña et al., 2007; Thomas and Versalovic, 2010). Đặc biệt, probiotic còn có liên quan đến việc sản xuất các chất kháng khuẩn, chẳng hạn như axit hữu cơ hoặc bacteriocin (Mountzouris et al., 2009). Không giống như thuốc kháng sinh, chế phẩm vi sinh không gây ra sự xuất hiện của vi khuẩn kháng thuốc hoặc dư lượng thuốc và thân thiện với môi trường (Hung et al., 2012).

Để được xem là probiotic, các vi sinh vật phải đáp ứng một số nguyên tắc liên quan đến tính an toàn và đặc tính sinh học của chúng. Vi khuẩn axit lactic là một trong những probiotic phổ biến đóng vai trò thiết yếu trong quá trình lên men thực phẩm. Đối với sử dụng loại vi khuẩn này, các yêu cầu về đánh giá an toàn đã tăng lên; chúng không được biểu hiện hoạt động gây bệnh cũng như gen mã hóa kháng kháng sinh (antibiotic resistance – AR) và duy trì tính ổn định di truyền. Việc đánh giá tính nhạy cảm với kháng sinh của *Lactiplantibacillus* gần đây đã phát triển do khả năng lây lan khả năng kháng thuốc của chúng thông qua chuyển gen ngang trong đó có sự tham gia của plasmid, transposon và integron; các yếu tố di động này bao gồm các gen AR chủ yếu chịu trách nhiệm cho quá trình chuyển giao vật liệu di truyền trong và giữa các loài (Gueimonde et al., 2013b). Số lượng lớn *Lactiplantibacillus* trong các sản phẩm lên men và trong đường tiêu hóa hỗ trợ sự hiện diện của các cơ chế kháng thuốc khác nhau thông qua đột biến; khi vi khuẩn trở nên kháng thuốc, các gen AR sẽ được khuếch đại và có thể được truyền sang vật chủ khác.

Mặt khác, như bước đầu tiên để cung cấp chế phẩm sinh học trong chăn nuôi, cần phải đạt được mục tiêu tối ưu hóa môi trường tăng trưởng hiệu quả và chi phí thấp để nuôi cấy *Lactiplantibacillus*. Môi trường để *Lactiplantibacillus* sinh trưởng tốt cần phải đảm bảo đầy đủ nhiều yếu tố như carbohydrate, axit amin, peptide, vitamin và muối Mg/Mn. Ngoài ra, hoạt động tăng trưởng của *Lactiplantibacillus* bị ảnh hưởng bởi các điều kiện nuôi cấy như độ pH, nhiệt độ, công thức môi trường và các yếu tố khác. Trong số các thành phần, chiết xuất nấm men được ghi nhận có ý nghĩa rất lớn trong việc tăng cường sản xuất sinh khối trong điều kiện nuôi cấy chi phí thấp (Manzoor

et al., 2017). Trong nghiên cứu này, nhằm sản xuất chế phẩm sinh học để cung cấp cho gia cầm, khả năng kháng khuẩn, tính an toàn của các chủng *Lactiplantibacillus* được phân lập từ phân gà bản địa đã nghiên cứu. Ngoài ra, các điều kiện sinh trưởng tối ưu của các chủng *Lactiplantibacillus* có chế phẩm sinh học đã được nghiên cứu để sản xuất khối lượng tế bào cao ở quy mô bán công nghiệp.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu

- Probiotic: 68 chủng thuộc loài *Lactiplantibacillus* (phân lập từ phân gà bản địa, nuôi bán chăn thả, không sử dụng chế phẩm probiotic nào) được sàng lọc qua đặc tính hình thái và sinh hóa.

- Vi khuẩn gây bệnh: Các chủng vi khuẩn được sử dụng trong nghiên cứu được phân lập từ gà bản địa bị tiêu chảy, bao gồm *E. coli* FG31-1 (Genbank ID: UGWX01000002.1) mang gen độc lực *invA*; *S. typhimurium* FC13827 (Genbank ID: MK886517.1) và *Proteus mirabilis* MPE4069 (Genbank ID: CP053718.1) mang gene độc lực *stn*.

Các chủng vi khuẩn được bảo quản trong môi trường BHI và glycerol, ở nhiệt độ -20°C tại Phòng thí nghiệm Vi sinh, Khoa Chăn nuôi thú y, Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

2.2. Phương pháp đánh giá khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh đường tiêu hóa ở gà

Hoạt tính kháng khuẩn của các chủng *Lactiplantibacillus* đối với vi khuẩn gây bệnh (*E. coli* FG31-1, *S. typhimurium* FC13827 và *Proteus mirabilis* MPE4069) được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch (Georgieva et al., 2015). Địa Muller Hinton Agar (MHA) được phủ với huyền phù vi khuẩn gây bệnh (với OD_{630nm} = 0,5). Sau 15–20 phút, sáu giếng (cách nhau 30 mm) được đục trên thạch MHA. Mỗi giếng chứa 100 µL dịch nuôi cấy canh thang MRS qua đêm của các chủng *Lactiplantibacillus* đã chọn (điều chỉnh thành OD_{630nm} = 0,5). Dịch được để khuếch tán vào thạch trong một giờ ở 40°C. Sau đó, đĩa được ủ ở 37°C trong 24 giờ. Công thức đánh giá: Đường kính (ĐK, mm) = ĐK vòng vô khuẩn – ĐK giếng. Kết quả được xem là có tính kháng khuẩn khi ĐK ≥ 10 mm (Georgieva et al., 2015).

2.3. Phương pháp đánh giá tính an toàn của chủng *Lactiplantibacillus* được tuyển chọn

Đánh giá khả năng dung huyết: Các chủng *Lactiplantibacillus* phân lập (10⁸ CFU/mL) được cấy lên đĩa thạch MRS bổ sung 7% máu cừu. Sau 48 giờ ủ ở 37°C, quan sát vùng dung huyết. Mức độ dung huyết được phân loại thành vùng màu xanh lục nhạt – vàng đậm quanh khuẩn lạc là dung huyết α, vùng màu vàng nhạt là dung huyết β, và không có vùng dung huyết là γ (Shokryazdan et al., 2014).

Thử nghiệm khả năng đề kháng kháng sinh: Các chủng *Lactiplantibacillus* được nuôi đến 10^8 CFU/mL (OD 0,48 – 0,52), sau đó hút 100 μ L dịch vi khuẩn trải đều trên mặt thạch MH, với độ dày thạch là 4 mm; đặt đĩa kháng sinh (5 mm) lên mặt thạch, ủ 37°C trong 24 giờ, và đo ĐK vòng vô khuẩn. Thử nghiệm kháng sinh đang được sử dụng phổ biến cho gia cầm, gồm ciprofloxacin, erythromycin, tetracycline, gentamicin, ampicillin, vancomycin, streptomycin, kanamycin, doxycycline (Oxoid, Anh). Đọc kết quả tùy thuộc từng loại vi khuẩn và mỗi loại kháng sinh có giới hạn độ nhạy, kháng thuốc khác nhau, kết quả được đối chiếu theo CLSI (2021) dựa trên ĐK vòng vô khuẩn: kháng (R), nhạy trung bình (I), và nhạy (S).

2.4. Phương pháp định danh các chủng *Lactiplantibacillus*

Chọn chủng giám định gen thông qua phân tích trình tự đoạn gen ổn định mã hóa ribosome 16S rRNA. Các môi xuôi và ngược 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) và 1492R (TACGGCTACCTTGTTACGACTT) được sử dụng để khuếch đại ở 1.500 bp (Taheri et al., 2012). Phản ứng PCR được thực hiện với 20 μ L chứa NZYTaq 2 $\times$ Green Master Mix, 0,5 μ L mỗi đoạn môi xuôi và ngược (nồng độ là 0,3 μ M), 6 μ L nước không có DNase và 2 μ L khuôn mẫu DNA (khối lượng 50 ng). Sau khuếch đại, 10 μ L của sản phẩm PCR được phân

tích điện di và sau đó được chiếu sáng UV để hình ảnh hoá DNA, với chất nhuộm huỳnh quang ethidium bromide (ImageMaster, Pharmacia Biotech, Anh). Sản phẩm thu được từ phản ứng PCR có chiều dài khoảng 1,5 kb được tinh chế và giải trình tự bằng các môi giống với môi PCR (27F và 1492R). Sau khi giải trình tự bằng phương pháp Sanger và BLAST, dữ liệu được so sánh với cơ sở dữ liệu Genbank của NCBI để xác định các chủng *Lactiplantibacillus*.

2.5. Tối ưu hóa môi trường nuôi cấy để sản xuất chủng probiotic

Các chủng lợi khuẩn đã được lựa chọn và tác động của các môi trường nuôi cấy khác nhau được pha chế với nhiều thành phần khác nhau đến sản xuất sinh khối đã được nghiên cứu. Kết hợp các thành phần khác nhau, MRS và MRSc (pH được kiểm soát bằng cách thêm NaOH 5N ở thời điểm 6, 18 và 24 giờ) đã được đánh giá, thành phần môi trường được thể hiện trong Bảng 1. Trước khi thử nghiệm, các chủng *Lactiplantibacillus* đã chọn đã được pha (2%) trong 5 mL của mỗi môi trường đã chuẩn bị và nuôi cấy phụ hai lần trong 12 giờ ở 37°C. Đối với mỗi môi trường và chủng *Lactiplantibacillus*, *Lactiplantibacillus* sống được định lượng sau khi pha loãng và nuôi cấy trên thạch MRS. Tốc độ tăng trưởng tối đa (μ h⁻¹) và tiềm năng tăng trưởng (CFU/mL ở thời điểm 24 giờ – CFU/mL ở thời điểm 0 giờ) đã được xác định.

Bảng 1. Môi trường nuôi cấy được sử dụng và thành phần

Nguyên liệu	Môi trường nuôi cấy (g L ⁻¹)					
	Mpep	Mgl	Mlac	Mw	Msm	MRS/MRSc
Peptone casein	9	–	–	–	–	–
Beef peptone	–	–	–	–	–	10
Bột sữa gầy	–	–	10	–	100	–
Yeast extract	3,12	20	10	3,12	10	5
WPC 80	–	–	–	9	–	–
Beef extract	–	–	–	–	–	10
Glucose	6,27	10	–	6,27	–	20
Lactose	–	–	30	–	–	–
Ammonium citrate	–	2	–	–	–	2
Sodium acetate	–	5	–	–	–	5
L-cistein	0,25	–	–	0,25	–	–
KH ₂ PO ₄	–	–	5,6	–	–	2
Na ₂ HPO ₄	6,27	–	3,6	6,27	–	–
NaCl	2,5	–	–	2,5	–	–
MgSO ₄ .7H ₂ O	–	0,1	0,05	–	–	0,1
MnSO ₄ .H ₂ O	–	0,05	0,038	–	–	0,05
Tween 80	–	1	–	–	–	1
pH	6,5	5,9	6,5	6,5	6,2	6,5

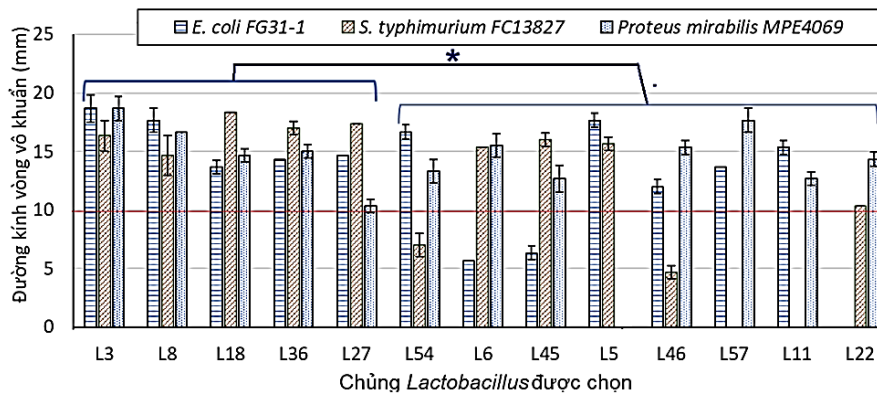
2.6. Thử nghiệm trên thiết bị nuôi công nghiệp và xác định tốc độ khuấy

Phương pháp lên men bán công nghiệp được tiến hành theo hướng dẫn của Stanbury et al. (2016). Lợi

khẩn được nuôi trong thiết bị lên men 30 L (Ruian Global Co., Model GXL30) chứa 20 L môi trường (đã được lựa chọn tối ưu từ nội dung trên), cấy 5% giống lợi khuẩn *Lactiplantibacillus* spp. được tuyển chọn; nhiệt độ nuôi ở 37°C và pH ban đầu (6,5) sau khi khử

trùng. Độ pH kiểm soát ở cùng một giá trị trong quá trình nuôi được điều chỉnh bằng 2,5M NaOH và 2,5M HCl. Thời gian nuôi cấy là 24 giờ. Trong quá trình nuôi sử dụng chất chống tạo bọt vô trùng. Khối lượng tế bào được xác định ở các tốc độ khuấy 10, 30, 50, 100 và 150 vòng/phút. Tóm tắt, lấy 50 mL dịch mẫu *Lactiplantibacillus* cho vào ống ly tâm ở tốc độ 4.000 vòng/phút trong 10 phút, loại bỏ 45 mL dịch lỏng phía trên và giữ lại 5 mL cặn tế bào ở đáy ống; thực hiện rửa tế bào bằng cách thêm 10 mL nước cất vào ống và ly tâm ở 4.000 vòng/phút trong 5 phút, thực hiện lặp lại 1 – 2 lần; sấy khô tế bào bằng cách chuyển lớp cặn tế bào vào chén sứ và đặt vào lò sấy ở 70°C trong 24 giờ; cân khối lượng chén sứ chứa tế bào khô. Tính khối lượng tế bào khô (KL) = KL chén sứ với tế bào khô – KL chén sứ. Tính khối lượng tế bào khô trên 1 lít mẫu: KL tế bào khô (g/L) = (KL tế bào khô/50 mL) x 1.000 mL.

2.6. Xử lý thống kê



Hình 1. Đánh giá một số đặc tính kháng khuẩn của các chủng *Lactiplantibacillus* được lựa chọn. *thể hiện sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$)

Với mục tiêu tìm chủng vi khuẩn tiềm năng thay thế kháng sinh, việc đánh giá hoạt tính kháng khuẩn là tiêu chí tiên quyết. Hoạt tính đối kháng với 3 chủng vi khuẩn Gram âm (*E. coli* FG31-1, *S. typhimurium* FC13827 và *Proteus mirabilis* MPE4069) gây bệnh đường tiêu hóa trên gà được thử nghiệm với 67 chủng *Lactiplantibacillus* được phân lập. Kết quả ở Hình 1 đã chọn ra được 13 chủng *Lactiplantibacillus* (19,41%) có hoạt động ức chế chống lại ít nhất 2 trong 3 mầm bệnh (ĐK ≥ 10 mm). Còn lại, 11 chủng (16,42%) có thể ức chế được 1 trong 3 mầm bệnh và 43 chủng (64,17%) không ức chế được mầm bệnh nào (dữ liệu không hiển thị). Nhìn chung, đối với cả 3 chủng vi khuẩn gây bệnh, 5 chủng *Lactiplantibacillus* (L3, L8, L27, L18 và L36) có khả năng kháng khuẩn trung bình (14,11 – 17,89 mm) cao hơn có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so với 8 chủng còn lại (8,21 – 12,33 mm).

Như vậy, từ kết quả trên cho thấy, chủng *Lactiplantibacillus* phân lập từ gà bản địa có khả năng chống lại một số vi khuẩn gây bệnh phân lập được từ những gà bản địa bị bệnh tiêu chảy. Theo Alvarez-Sieiro et al. (2016), *Lactiplantibacillus* có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh thông qua

Tất cả các xét nghiệm được thực hiện lặp lại ba lần và dữ liệu được biểu thị dưới dạng trung bình (Mean) $\pm$ độ lệch chuẩn (SD). Phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm SPSS (Phiên bản 22) với khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,05$ giữa các nghiệm thức bằng phép thử oneway ANOVA, sau đó kiểm tra bằng kiểm định Tukey (Tukey's Honestly Significant Difference).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Lựa chọn chủng *Lactiplantibacillus* dựa trên các đặc tính thay thế kháng sinh

Chủng *Lactiplantibacillus* được phân lập từ nguồn gà bản địa tại Thừa Thiên Huế và được kiểm tra khả năng kháng khuẩn đối với những vi khuẩn đã được phân lập từ những gà bản địa bị tiêu chảy. Kết quả xét nghiệm khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh trên gà của các chủng *Lactiplantibacillus* được trình bày ở Hình 1.

nhieu cơ chế, bao gồm sản xuất axit lactic từ việc lên men carbohydrate, từ đó làm giảm pH môi trường để ức chế sự phát triển của vi khuẩn (Alvarez-Sieiro et al., 2016). Bên cạnh đó, *Lactiplantibacillus* spp. có khả năng sản xuất các hoạt chất kháng khuẩn như bacteriocin, hydrogen peroxide, H_2O_2 (Hertzberger et al., 2014) và các axit hữu cơ khác như axit acetic, axit propionic... (Argyri et al., 2013). Hoạt động này, cùng với cơ chế loại trừ cạnh tranh, trong đó các chủng lợi khuẩn cạnh tranh với mầm bệnh để lấy chất dinh dưỡng và vị trí gắn kết, đã ngăn chặn mầm bệnh xâm nhập vào ruột.

3.2. Đánh giá tính an toàn của các chủng *Lactiplantibacillus* được lựa chọn

3.2.1. Hoạt động dung huyết

Vi khuẩn dương tính với dung huyết được xem là không an toàn để sử dụng làm chế phẩm sinh học do độc lực của chúng gây phù nề và thiếu máu. Hemolysin do mầm bệnh tạo ra được cho là có tác dụng ly giải tế bào vật chủ để giải phóng các hợp chất chứa sắt như huyết sắc tố, có lợi cho sự phát triển của vi khuẩn có hại trong cơ thể vật chủ (Reuben et al., 2019). Trong khi kết quả xét nghiệm dung huyết β

được xem là có hại, thì dung huyết γ và α được coi là an toàn. Trong nghiên cứu này, tất cả các chủng đều biểu hiện dung huyết α (Hình 2), biểu hiện an toàn. Tương tự, một số nghiên cứu cho thấy chủng *Lactiplantibacillus* phân lập từ phân gà không có khả năng gây dung huyết (Doron and Snyderman 2015; Sebouai et al., 2024).



Hình 2. Các chủng có vùng sáng màu vàng đậm quanh khuẩn lạc, biểu hiện dung huyết α

3.2.2. Khả năng kháng kháng sinh

Sự an toàn của chủng vi sinh đã nhận được sự chú ý ngày càng tăng do khả năng chuyển giao và lan truyền các gen kháng kháng sinh giữa các vi sinh vật (Campedelli et al., 2019). Do đó, sự vắng mặt của các gen mã hoá kháng kháng sinh là lựa chọn quan trọng để đảm bảo an toàn cho chế phẩm vi sinh.

Bảng 2. Khả năng kháng kháng sinh của các chủng *Lactobacillus* được lựa chọn

Kháng sinh	Nồng độ	L3	L8	L18	L27	L36
	(μg^{-1})					
Ciprofloxacin	30	S	S	S	IS	S
Erythromycin	15	IS	S	IS	S	IS
Tetracycline	30	IS	IS	IS	IS	IS
Gentamicin	10	IS	S	IS	S	S
Ampicillin	10	S	S	S	S	S
Vancomycin	30	R	IS	IS	R	IS
Streptomycin	10	S	S	IS	S	IS

Bảng 3. Xác định các chủng *Lactobacillus* bằng giải trình tự 16S rRNA

Mẫu phân lập	Chủng <i>Lactiplantibacillus</i>	Tỉ lệ tương đồng (%)	ID GenBank của chủng tham chiếu
L3	<i>L. plantarum</i> JDM1	100	CP001617.1
L8	<i>L. plantarum</i> 1582	99,86	MT597487.1
L18	<i>L. acidophilus</i> NCFM	98,73	CP000033.2
L27	<i>L. agilis</i> DSM 20509	100	KM886859.1

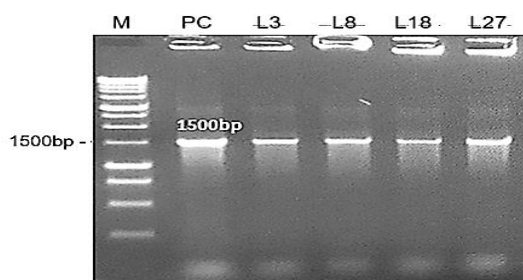
Kanamycin	30	S	S	S	S	S
Doxycycline	30	S	S	S	S	S

Chú thích: Độ nhạy kháng sinh được biểu thị bằng R (kháng), IS (trung bình) hoặc S (nhạy) theo CLSI (2021) cho từng loại kháng sinh.

Trong nghiên cứu này, chủng L3 và L27 đã kháng (R) với vancomycin, trong khi các chủng khác thì ở mức nhạy (IS). Đối với các kháng sinh còn lại, mức độ khác của các chủng *Lactiplantibacillus* ở mức trung bình (IS) hoặc nhạy (S). Tuy nhiên, theo một số tác giả, khả năng kháng vancomycin của *Lactiplantibacillus* sẽ không được truyền sang vi khuẩn gây bệnh vì đây là một đặc điểm nội tại, được mã hóa bởi các gen nhiễm sắc thể (Gueimonde et al., 2013a) và sự thay thế đầu cuối D -alanine bằng D -lactate hoặc D -serine trong muramyl-pentapeptide ngăn chặn sự gắn kết của vancomycin (Lee et al., 2001). Như vậy, nhìn chung các chủng *Lactiplantibacillus* được lựa chọn đều an toàn và sử dụng cho các thử nghiệm tiếp theo.

3.3. Định danh vi khuẩn *Lactiplantibacillus* tuyển chọn

Qua xác định bằng trình tự 16S rRNA cho thấy các chủng được lựa chọn đều xuất hiện với kích thước 1.500 bp sau điện di trên gel agarose. Trình tự 16S rRNA được kiểm tra trên GenBank. Bốn trong năm chủng *Lactiplantibacillus* được định danh với ký hiệu lần lượt là *L. plantarum* 1582, *L. plantarum* JDM1, *L. acidophilus* NCFM và *L. agilis* DSM 20509 thông qua giải trình tự gen 16S rRNA. Các trình tự gen này đã được đánh giá dựa trên cơ sở dữ liệu NCBI với các số truy cập ID tương ứng là MT597487.1, CP001617.1, CP000033.2 và KM886859.1.

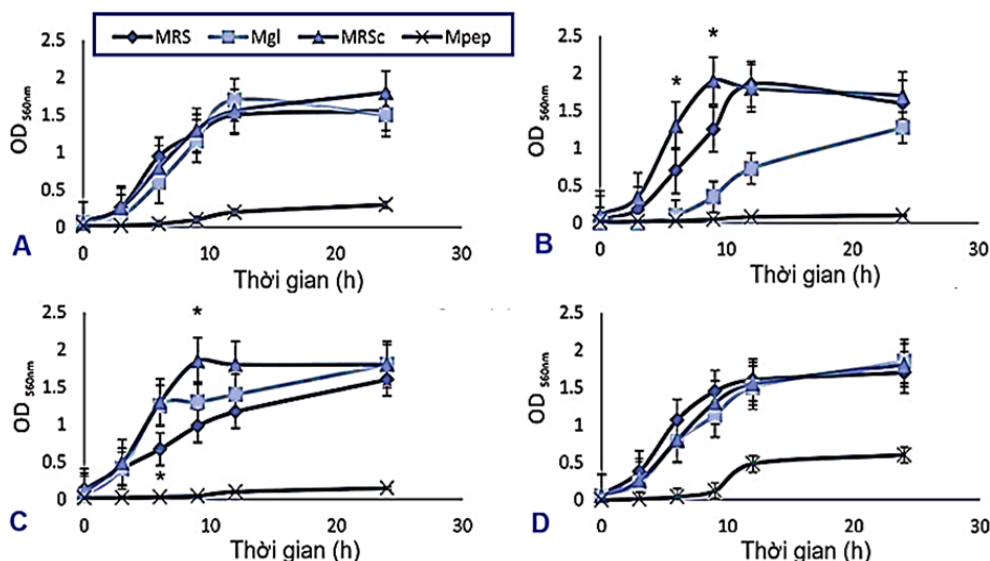


Hình 3. Hình ảnh điện di trên gel agarose của sản phẩm PCR sau khuếch đại gen 16S rRNA: làn M, làn PC (kiểm soát dương tính), và các làn 1-4 là các chủng *Lactiplantibacillus* dương tính (L3, L8, L18 và L27) ở 1.500 bp

3.4. Tối ưu hóa các điều kiện sinh trưởng cho *Lactiplantibacillus* được chọn

Các thí nghiệm sơ bộ để tối ưu hóa sản xuất quy mô lớn cần thiết để cung cấp số lượng lớn vi khuẩn sống probiotic cho vật nuôi đã được thực hiện; sản xuất quy mô lớn và chi phí thấp các loại vi khuẩn này đang trở thành một vấn đề quan trọng. Do đó, khả năng sản xuất số lượng lớn tế bào, các thông số sinh trưởng và việc sử dụng các thành phần môi trường chi phí thấp nên được xem xét để tối ưu hóa môi trường tăng trưởng. Việc lựa chọn các chủng vi khuẩn tiềm năng thay thế kháng sinh trong phòng trị bệnh tiêu chảy ở gà dựa trên khả năng kháng khuẩn để áp dụng làm probiotic đã được thực hiện trước đó cùng với các đặc điểm an toàn cho phép lựa chọn 4 chủng vi khuẩn (*L. plantarum* L3, *L. plantarum* L8, *L. acidophilus* L18, và *L. agilis* L27) để sàng lọc sơ bộ các điều kiện nuôi cấy tối ưu để tạo ra khối lượng tế bào cao. Với mục đích này, 5 môi trường khác nhau bao gồm một số nguồn nitơ (sữa tách kem, protein cô đặc hòa tan từ váng sữa, peptone casein, chiết xuất nấm men) và carbon (glucose, lactose) đã được thử nghiệm với thành phần được thể hiện trong Bảng 1. Kết quả cho

thấy sự phát triển của vi khuẩn *Lactiplantibacillus* vào thành phần của các môi trường nuôi cấy (Hình 4 và Bảng 4). Động học khác nhau được hiển thị khi đo cả OD và số lượng CFU/mL. Khi xác định OD560 max trong môi trường trong suốt (Mpep, Mgl, MRSc và MRS), *L. plantarum* 1582, *L. plantarum* JDM1, *L. acidophilus* NCFM không thể phát triển trong môi trường Mpep có chứa peptone, trong khi *L. agilis* DSM 20509 lại có sự phát triển ít (Hình 3). Sự phát triển tốt hơn được tìm thấy đối với cả bốn loại vi khuẩn *Lactiplantibacillus* trong môi trường Mgl (có chứa glucose) và *L. acidophilus* NCFM và *L. agilis* DSM 20509 biểu hiện OD560max cao hơn sau 24 giờ. Tuy nhiên, các giá trị OD tối đa cũng được quan sát thấy đối với vi khuẩn *Lactiplantibacillus* khi sử dụng MRSc; Giá trị MRS (pH tự do) thấp hơn. Khi các thông số sinh trưởng được tính toán từ số lượng khuẩn lạc (CFU/mL) thu được bằng phương pháp nuôi cấy trên đĩa, *Lactiplantibacillus* cho thấy mức tăng trưởng cao nhất ($>10^9$ CFU/mL) khi được cấy vào môi trường Mgl, Mlac, MRS và MRSc; mức sinh trưởng thấp hơn trong môi trường Mw và Msm trong khi mức tăng trưởng kém hơn trong môi trường Mpep. Số lượng tế bào cao nhất đạt được trong Mgl (*L. plantarum* 1582 và *L. acidophilus* NCFM), Mlac (*L. plantarum* 1582, *L. plantarum* JDM1 và *L. agilis* DSM 20509) và MRS (*L. plantarum* 1582 và *L. acidophilus* NCFM). Theo báo cáo của Manzoor et al. (2017), ngay cả khi môi trường MRS đại diện cho một điều kiện phong phú và phù hợp để hỗ trợ sự tăng trưởng tối ưu của *Lactiplantibacillus*, thì chi phí pha chế cao khiến chúng không khả thi cho các ứng dụng thương mại quy mô lớn. Từ kết quả của nghiên cứu này, Mlac (g/L: sữa gầy, 10; chiết xuất nấm men, 10; lactose, 30) và Mgl (g/L: chiết xuất nấm men, 20; glucose, 10) cho thấy điều kiện tốt để sản xuất bán công nghiệp hoặc công nghiệp các loại lợi khuẩn *Lactiplantibacillus* sử dụng cho chăn nuôi đã chọn (Bảng 4).



Hình 4. Động học sinh trưởng của các chủng vi khuẩn *Lactiplantibacillus* trong các môi trường nuôi cấy khác nhau. (A) *L. plantarum* 1582, (B) *L. plantarum* JDM1, (C) *L. acidophilus* NCFM và (D) *L. agilis* DSM 20509

Sự hiện diện của natri axetat trong môi trường Mgl, một thành phần của môi trường MRS thương mại, được báo cáo là nguồn năng lượng và tác nhân chọn lọc đối với vi khuẩn *Lactiplantibacillus* (Stiles et al., 2002). Mặt khác, môi trường cô đặc protein whey (protein, 78%; carbohydrate, 4,5%) (Mw) cũng như môi trường chứa sữa gầy (Msm), một nguồn nitơ (casein, ~ 35%) và carbon (lactose, ~ 50%) tương ứng, không thể tạo ra sinh khối vi khuẩn *Lactiplantibacillus* cao. Kết quả này không phù hợp với lợi thế về kinh tế và tăng trưởng của môi trường nuôi cấy dựa trên sữa gầy được sử dụng để sản xuất sinh khối *Lactiplantibacillus* (Kusnadi and Afriyan, 2012). Trùng hợp với kết quả tìm thấy khi đo OD (Hình 1), sản lượng sinh khối thấp nhất của các chủng *Lactiplantibacillus* được chọn thu được trong môi trường chứa casein peptone (Mpep), *L.*

plantarum 1582, *L. plantarum* JDM1 và *L. agilis* DSM 20509 cho thấy giá trị CFU/mL tối đa thấp hơn (Bảng 4). Riêng đối với *L. acidophilus*, Olson and Aryana (2012)) đã báo cáo sự giảm tăng trưởng khi có peptone so với sữa gầy, tương tự với kết quả từ nghiên cứu này. Môi trường nuôi cấy biến tính bao gồm chiết xuất nấm men, glucose và natri axetat/natri glutamat là các thành phần chính, loại bỏ peptone (nguồn nitơ đắt tiền) đã được sử dụng để sản xuất sinh khối bằng các chủng *L. plantarum* có mục đích sử dụng làm chế phẩm sinh học (Hwang et al., 2011). Môi trường tối ưu chứa các chất thải nông nghiệp-công nghiệp như váng sữa phô mai, chiết xuất nấm men công nghiệp, dịch ngâm ngô, bột đậu nành và mật mía cùng nhiều loại khác đã được thử nghiệm để sản xuất sinh khối vi khuẩn *Lactiplantibacillus* (Hwang et al., 2011; Manzoor et al., 2017).

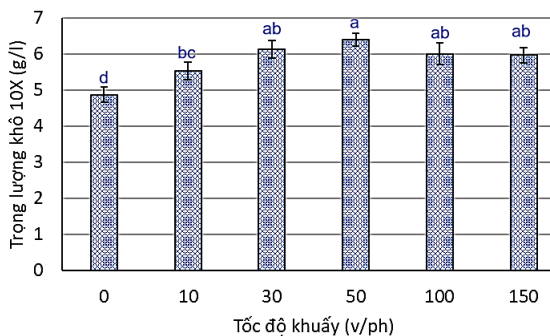
Bảng 4. Các thông số sinh trưởng của các chủng vi khuẩn *Lactiplantibacillus* được chọn

Chủng lợi khuẩn	Chỉ số sinh trưởng	Môi trường nuôi cấy						
		Mpep	Mgl	Mlac	Mw	Msm	MRS	MRSct†
<i>L. plantarum</i> 1582	μ (h ⁻¹)	0,06	0,76	0,67	0,10	0,13	0,48	0,31
	Sinh trưởng	0,07	4,97	4,40	0,22	0,30	2,12	1,35
	CFU/ml max	1,20 × 10 ³	2,80 × 10 ⁹	2,80 × 10 ⁹	2,00 × 10 ⁵	1,00 × 10 ⁵	1,08 × 10 ⁹	1,20 × 10 ⁸
	OD ₅₆₀ nm max	0,30	1,70	-	-	-	1,50	1,80
<i>L. plantarum</i> JDM1	μ (h ⁻¹)	0,05	0,22	0,39	0,15	0,18	0,45	0,84
	Sinh trưởng	0,11	3,13	4,11	1,60	2,14	1,97	3,67
	CFU/ml max	1,30 × 10 ⁴	9,55 × 10 ⁷	1,29 × 10 ⁹	4,00 × 10 ⁶	1,40 × 10 ⁷	5,14 × 10 ⁸	9,70 × 10 ⁸
	OD ₅₆₀ nm max	0,10	1,30	-	-	-	1,80	1,90
<i>L. acidophilus</i> NCFM	μ (h ⁻¹)	0,08	1,10	0,36	0,78	0,10	0,51	0,44
	Sinh trưởng	0,18	4,78	2,39	5,14	1,00	1,29	0,96
	CFU/ml max	1,70 × 10 ⁵	6,03 × 10 ⁹	8,90 × 10 ⁸	1,40 × 10 ⁸	1,00 × 10 ⁶	1,62 × 10 ⁹	1,23 × 10 ⁸
	OD ₅₆₀ nm max	0,15	1,80	-	-	-	1,60	1,8
<i>L. agilis</i> DSM 20509	μ (h ⁻¹)	0,20	0,58	0,56	0,42	0,36	0,62	0,38
	Sinh trưởng	2,08	0,75	2,44	1,86	1,57	1,11	1,69
	CFU/ml max	2,48 × 10 ⁷	3,24 × 10 ⁸	1,12 × 10 ⁹	1,80 × 10 ⁸	2,00 × 10 ⁸	7,55 × 10 ⁸	8,70 × 10 ⁸
	OD ₅₆₀ nm max	0,60	1,85	-	-	-	1,70	1,90

Chú thích: -, không phát hiện; OD₅₆₀nm max, được xác định trong môi trường trong suốt tại thời điểm μ (h⁻¹)).

3.5. Kiểm chứng điều kiện tối ưu trên thiết bị lên men bán công nghiệp

Hỗn hợp 4 chủng *Lactiplantibacillus* đã được định danh được nuôi trên thiết bị 30 L chứa 20 L môi trường môi trường nuôi cấy có chứa glucose và bột sữa gầy (Mgl và Mlac), ở 37°C, với 5% tiếp giống, thời gian 24 giờ. Sinh khối tăng đáng kể ($P < 0,05$) từ 0,49 đến 0,64 g/L đến khi tăng tốc độ khuấy từ 10-50 vòng/phút và có xu thế giảm nhẹ xuống còn khoảng 0,6 g/L khi tăng cao hơn. Như vậy, tốc độ khuấy thích hợp cho sự sinh trưởng của các chủng lợi khuẩn là 50 vòng/phút (Hình 5).



Hình 5. Lựa chọn tốc độ khuấy thích hợp nhằm tối ưu hoá quá trình lên men lactic

Tốc độ khuấy có vai trò lớn đối với sinh trưởng của các vi sinh vật khi nuôi trong các thiết bị lên men, nó vừa có tác dụng đảo trộn môi trường vừa giúp phân tán đều dinh dưỡng tiếp xúc với bề mặt, làm tăng khả năng hấp thụ dinh dưỡng của tế bào. Sinh khối vi khuẩn tăng đáng kể ($P < 0,05$) từ 0,49 đến 0,64 g/L khi tăng tốc độ khuấy từ 10 đến 50

vòng/phút, phù hợp với các nghiên cứu trước đây cho thấy khuấy trộn hỗ trợ quá trình trao đổi chất và sinh trưởng của vi sinh vật (Garcia-Ochoa and Gomez, 2009; Doran, 2012). Tuy nhiên, việc tăng tốc độ khuấy lên trên 50 vòng/phút lại không làm tăng sinh khối thêm, thậm chí còn có xu hướng giảm nhẹ. Điều này có thể giải thích là tốc độ khuấy lớn đã làm tổn thương hoặc thậm chí phá vỡ tế bào vi khuẩn, ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của chúng (Chisti, 2009).

4. KẾT LUẬN

Từ 68 chủng vi khuẩn được phân lập từ phân gà bản địa, 5 chủng *Lactiplantibacillus* (L3, L8, L18, L27 và L36) có khả năng kháng khuẩn cao đối với các mầm bệnh đường ruột trên gà trong nghiên cứu và an toàn do không có khả năng dung huyết và khả năng kháng kháng sinh thấp. Giải trình tự 16S rRNA xác định 4 trong 5 chủng này là *L. plantarum* 1582, *L. plantarum* JDM1, *L. acidophilus* NCFM và *L. agilis* DSM 20509. Các chủng này đạt được sinh khối cao nhất khi nuôi cấy trong môi trường chứa glucose và bột sữa gầy (Mgl và Mlac). Thử nghiệm qua mô hình nuôi cấy bán công nghiệp cho thấy tốc độ khuấy 50 vòng/phút có thể đạt sinh khối cao nhất (0,6 g/l). Như vậy, 4 chủng *Lactiplantibacillus* được tuyển chọn có tiềm năng sử dụng làm chế phẩm sinh học ở quy mô bán công nghiệp thay thế kháng sinh trong chăn nuôi gà.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đề tài Khoa học Cấp Bộ GD&ĐT (mã số: B2023-DHH-24).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., Kuipers, O.P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiol Biotechnol*, 100(3), 2939-2951. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9>
- Argyri, A.A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.A., Tsakalidou, E., Nychas, G.J., Panagou, E.Z., Tassou, C.C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology*, 33, 282-291. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.005>
- Campedelli, I., Mathur, H., Salvetti, E., Clarke, S., Rea, M.C., Torriani, S., Ross, R.P., Hill, C., O'Toole, P.W. (2019). Genus-Wide Assessment of Antibiotic Resistance in *Lactobacillus* spp. *Applied Environment Microbiology*, 85(3), 121-129. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.01738-18>
- Chisti, Y. (2009). Shear Sensitivity. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, 7, 1-40. doi: <https://doi.org/10.1002/9780470054581.eib543>
- Doran, P. M. (2012). Bioprocess engineering principles: Second edition. *Bioprocess Engineering Principles: Second Edition*, 1-919.
- Doron, S., and Snyderman, D. R. (2015). Risk and safety of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60(2), 129-34. doi: <https://doi.org/10.1093/cid/civ085>

- Ganguly, N., Bhattacharya, S., Sesikeran, B., Nair, G., Ramakrishna, B., Sachdev, H., Batish, V., Kanagasabapathy, A., Muthuswamy, V., and Kathuria, S. (2011). ICMR-DBT guidelines for evaluation of probiotics in food. *Indian Journal of Medical Research*, 134, 22-25.
- Garcia-Ochoa, F., and Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, 27, 153-176. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.006>
- Georgieva, R., Yocheva, L., Tserovska, L., Zhelezova, G., Stefanova, N., Atanasova, A., Danguleva, A., Ivanova, G., Karapetkov, N., Rumyan, N., and Karaivanova, E. (2015). Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as starter and probiotic cultures. *Biotechnology Biotechnology Equipment*, 29, 84-91. doi: <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.987450>
- Gueimonde, M., Sánchez, B., C, G. d. L. R.-G., and Margolles, A. (2013a). Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front Microbiology*, 4, 202. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00202>
- Gueimonde, M., Sánchez, B., G. de los Reyes-Gavilán, C., and Margolles, A. (2013b). Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 4, 202. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2013.00202>
- Hertzberger, R., Arents, J., Dekker, H. L., Pridmore, R. D., Gysler, C., Kleerebezem, M., and de Mattos, M. J. (2014). H(2)O(2) production in species of the *Lactobacillus acidophilus* group: a central role for a novel NADH-dependent flavin reductase. *Applied Environment Microbiology*, 80, 2229-39. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.04272-13>
- Hung, A. T., Lin, S.-Y., Yang, T.-Y., Chou, C.-K., Liu, H.-C., Lu, J.-J., Wang, B., Chen, S.-Y., and Lien, T.-F. (2012). Effects of *Bacillus coagulans* ATCC 7050 on growth performance, intestinal morphology, and microflora composition in broiler chickens. *Animal Production Science*, 52, 874-879. doi: <http://dx.doi.org/10.1071/AN11332>
- Hwang, C.-F., Chen, J.-N., Huang, Y.-T., and Mao, Z.-Y. (2011). Biomass production of *Lactobacillus plantarum* LP02 isolated from infant feces with potential cholesterol-lowering ability. *African Journal of Biotechnology*, 10, 7010-7020. doi: <https://doi.org/10.5897/AJB11.507>
- Kusnadi, J., and Afriyan, T. (2012). The growth of probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* in skim milk and Taro (*Colocasia esculenta* L. Schott Var. Boring) flour composite medium. In "International Conference on Environmental and Biological Sciences 2012".
- Lee, H., Gilliland, S., and Carter, S. (2001). Amylolytic Cultures of *Lactobacillus acidophilus*: Potential probiotics to improve dietary starch utilization. *Journal of Food Science* 66, 338-344. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb11343.x>
- Manzoor, A., Qazi, J. I., Haq, I. u., Mukhtar, H., and Rasool, A. (2017). Significantly enhanced biomass production of a novel bio-therapeutic strain *Lactobacillus plantarum* (AS-14) by developing low-cost media cultivation strategy. *Journal of biological engineering*, 11, 1-10. doi: <https://doi.org/10.1186/s13036-017-0059-2>
- Medellin-Peña, M. J., Wang, H., Johnson, R., Anand, S., and Griffiths, M. W. (2007). Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied Environment Microbiology*, 73, 4259-67. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.00159-07>
- Mountzouris, K. C., Balaskas, C., Xanthakos, I., Tzivinikou, A., and Fegeros, K. (2009). Effects of a multi-species probiotic on biomarkers of competitive exclusion efficacy in broilers challenged with *Salmonella enteritidis*. *British Poultry Science*, 50, 467-78. doi: <https://doi.org/10.1080/00071660903110935>
- Olson, D., and Aryana, K. (2012). Effect of prebiotics on *Lactobacillus acidophilus* growth and resulting pH changes in skim milk and a model peptone system. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 4, 121. doi: <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000081>
- Sebouai, M., Hamma-Faradji, S., Rezgui, A., Sobhi, W., Belaouni, H. A., Salah, R. B., Aksas, A., and Bendali, F. (2024). Encapsulated probiotic *Lactiplantibacillus* strains with promising applications as feed

- additives for broiler chickens. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 1-10. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2024.102213>
- Shokryazdan, P., Ramasamy, K., Chin, S., Alitheen, N., Liang, J., Faseleh jahromi, M., and Ho, Y. W. (2014). Isolation and characterization of *Lactobacillus* strains as potential probiotics for chickens. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 37, 141-157. doi:<https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103311>
- Stanbury, P., Whitaker, A., and Hall, S. J. (2016). *Principles of Fermentation Technology: Third Edition*.
- Stiles, J., Penkar, S., Plocková, M., Chumchalova, J., and Bullerman, L. (2002). Antifungal activity of sodium acetate and *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of Food Protection*, 65, 1188-1191. doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028x-65.7.1188>
- Taheri, A., Robinson, S. J., Parkin, I., and Gruber, M. Y. (2012). Revised selection criteria for candidate restriction enzymes in genome walking. *PLoS One*, 7, e35117. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035117>
- Thomas, C. M., and Versalovic, J. (2010). Probiotics-host communication: Modulation of signaling pathways in the intestine. *Gut Microbes*, 1, 148-63. doi:<https://doi.org/10.4161/gmic.1.3.11712>